

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. August 2002 (29.08.2002)

PCT

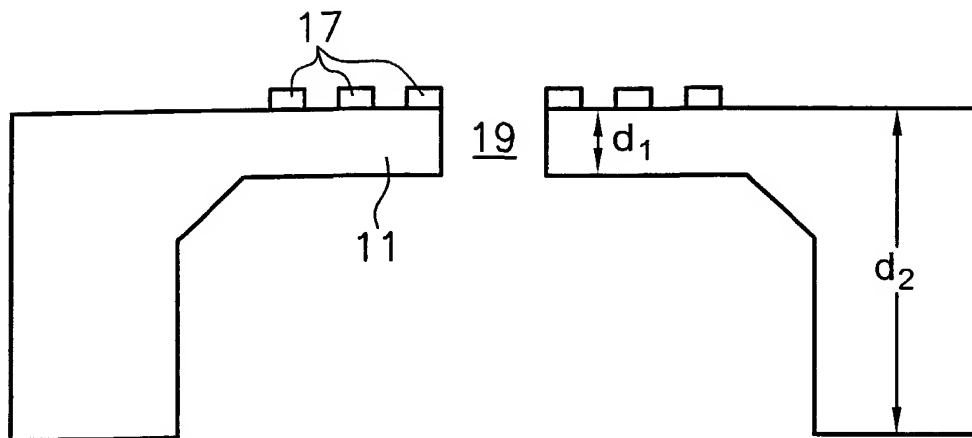
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/066596 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12M 1/34** (74) **Anwalt: WEIGELT, Udo**; Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser, Maximilianstr. 58, 80538 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/00078
- (22) Internationales Anmeldedatum:
7. Januar 2002 (07.01.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
011 00 458.7 8. Januar 2001 (08.01.2001) EP
- (71) Anmelder und
(72) **Erfinder: FERTIG, Niels** [DE/DE]; Steinickeweg 7, 80798 München (DE). **BEHRENDTS, Jan** [DE/DE]; Georgenstrasse 53, 80799 München (DE). **BLICK, Robert** [DE/DE]; Winthirstrasse 4, 80639 München (DE).
- (81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title:** DEVICE AND METHOD FOR ANALYZING ION CHANNELS IN MEMBRANES

(54) **Bezeichnung:** VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR UNTERSUCHUNG VON IONENKANÄLEN IN MEMBRANEN



(57) **Abstract:** The invention relates to devices and methods for analyzing ion channels in membranes. The invention is characterized by a biochip with a substrate wherein openings are provided in the form of an MxN matrix for receiving a cell membrane comprising at least one ion channel (I) or an artificial lipid membrane (Me), whereby $M \geq 1$ and $N \geq 1$.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft Vorrichtungen und Verfahren zur Untersuchung von Ionenkanälen in Membranen. Die Erfindung zeichnet sich aus durch einen Biochip mit einem Substrat, in welchem in Form einer MxN Matrix Öffnungen zur Aufnahme einer wenigstens einen Ionenkanal (I) umfassenden Zellmembran oder einer künstlichen Lipidmembran (Me) vorgesehen sind, wobei $M \geq 1$ und $N \geq 1$.



WO 02/066596 A2



Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Vorrichtung und Verfahren zur Untersuchung von Ionenkanälen in Membranen

Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft Vorrichtungen und Verfahren zur Untersuchung von Ionenkanälen in Membranen, insbesondere Vorrichtungen und Verfahren zur Durchführung der sogenannten Patch-Clamp-Technik mit Hilfe eines Biochips, insbesondere für die Anwendung in Hochdurchsatzverfahren.

Stand der Technik

Ionenkanäle sind Membranproteine, die als schaltbare Poren für Stromfluss dienen. Insbesondere sind Ionenkanäle als kleinste erregbare biologische Strukturen die fundamentalen Schaltelemente des Nervensystems. Die Ausstattung einer Nervenzelle mit Ionenkanälen verschiedenen Typs bestimmt daher wesentlich ihre Rolle bei der Informationsverarbeitung im Gehirn. Ähnliches gilt im übrigen auch für nicht neuronale erregbare Zellen, beispielsweise für die des Herzmuskels und seiner Erregungsleitungssysteme. Schaltvorgänge in Ionenkanälen werden unter anderem deshalb untersucht, um Aufschlüsse über etwaige Fehlfunktionen und deren Behebung durch Medikamente und dergleichen zu gewinnen.

Zur Untersuchung von Ionenkanälen in Zellmembranen im Hinblick auf deren Schaltvorgänge, d.h. deren Öffnungs- und Schließmechanismen, wird im Stand der Technik das Patch-Clamp-Verfahren eingesetzt. Hierzu werden sogenannte Patch-Clamp-Pipetten aus Glas verwendet. Eine derartige Pipette ist in Figur 5 dargestellt. Diese Pipette umfasst eine Öffnung 59, die ungefähr einen Durchmesser von 1 μm aufweist. Weiterhin umfasst die Pipette einen Pipettenschaft 58, in dem eine Elektrode 53 vorgesehen ist.

Zur Analyse eines Ionenkanals wird ein Membranfleck mittels einer derartigen mit Elektrolyt gefüllten Pipette angesaugt, so dass sich zwischen Membran und Glas ein enger Kontakt bildet. Auf diese Weise wird ein sehr hoher Abdichtwiderstand in einer Größenordnung $> 1 \text{ G}\Omega$ erhalten. Hierüber können sehr kleine Ionenströme durch die Membran bis hinab zu einigen 100 fA gemessen werden.

Nachteil der bekannten Vorrichtung ist jedoch, dass sie nicht geeignet ist, um gleichzeitig eine Vielzahl von Substanzen bzw. die Wirkung einer Substanz auf eine Vielzahl verschiedener (z.B. gentechnisch veränderter) Ionenkanäle zu untersuchen. Die bekannte Vorrichtung ist demnach nicht für Hochdurchsatzuntersuchungen geeignet. Dadurch ist diese Vorrichtung nur sehr eingeschränkt zum Substanz-Screening in der pharmazeutischen Industrie einsetzbar.

Weiterer Nachteil der bekannten Vorrichtung ist, dass die Zeitskala, auf der die Öffnungs- und Schließmechanismen in Ionenkanälen ablaufen, mit dieser Vorrichtung aus Glaspipette, Elektrode und Verstärker nur sehr eingeschränkt zugänglich ist. So besteht für Patch-Clamp-Verfahren mit dieser Vorrichtung eine Beschränkung der Bandbreite auf unter 100 kHz. Zur Untersuchung der Öffnungs- und Schließmechanismen in Ionenkanälen wären hingegen Zeitskalen, die einer Bandbreite von > 1 MHz entsprechen, wünschenswert.

Der Erfindung liegt demnach die Aufgabe zugrunde, eine Vorrichtung zur Untersuchung von Ionenkanälen in Zellmembranen zu schaffen, welche für Hochdurchsatzverfahren, beispielsweise zum Einsatz in der pharmazeutischen Industrie, geeignet ist und/oder die ein verbessertes Signal-zu-Rauschverhältnis und eine verbesserte Zeitauflösung zeigt.

Beschreibung der Erfindung

Diese Aufgabe wird durch einen Biochip zur Untersuchung von Ionenkanälen mit einem Substrat gelöst, in dem Öffnungen in Form eines $M \times N$ -Arrays zur Aufnahme einer wenigstens einen Ionenkanal umfassenden Zellmembran oder zur Aufnahme einer wenigstens einen Ionenkanal umfassenden künstlichen Lipidmembran vorgesehen sind, wobei $M \geq 1$ und $N \geq 1$.

Durch Verwendung eines derartigen Biochips kann auf die Pipette, deren relativ langer Schaft zu einer hohen Streukapazität führt, verzichtet werden. Vielmehr können von vornherein die kritischen geometrischen Parameter optimiert werden, wodurch das Signal-zu-Rauschverhältnis gegenüber dem Stand der Technik stark verbessert wird und demnach die Zeitauflösung erhöht wird. Dies gilt sowohl für Biochips mit einer einzigen Öffnung, d.h.

für $M = N = 1$, als auch für Biochips mit einer Mehrzahl von Öffnungen, d.h. $M > 1$ und/oder $N > 1$.

Durch die Mehrzahl der Öffnungen zur Aufnahme von Membranen, die Ionenkanäle enthalten, kann darüber hinaus im Fall $M > 1$ und/oder $N > 1$ die Patch-Clamp-Technik parallelisiert werden, wodurch sich M mal N Messungen simultan mit einem Chip vornehmen lassen.

Besonders vorteilhaft ist hierbei die Anpassung der Form dieses $M \times N$ -Arrays an die Geometrie der in der pharmazeutischen Industrie standardmäßig verwendeten 96-, 384- oder 1536-Küvettenplatten. Diese Küvettenplatten lassen sich in Pipetierautomaten einsetzen, mit denen Substanzen auf den hier beschriebenen Biochip vorteilhaft appliziert werden können. Vorteilhaft ist insbesondere, daß somit Lösungen oder Zellen durch Pipetierautomaten oder andere Pipetten- oder Kanülenanordnungen, die zueinander in starrer Anordnung stehen, gleichzeitig aus mehreren Küvetten der standardmäßig verwendeten Küvettenplatten entnommen und auf den Biochip aufgebracht werden können, da die Anordnung der Pipetten oder Kanülen zueinander zum Aufbringen der Lösungen oder Zellen auf den Biochip beibehalten werden kann.

Darüber hinaus ermöglicht der erfindungsgemäße Biochip, bedingt durch seine Geometrie, dass auf ihm aufgebrachte Membranen gegenüber der bekannten Vorrichtung wesentlich leichter zugänglich sind. So lassen sich die Membranen wesentlich besser beobachten, chemisch und/oder mechanisch und/oder elektrisch manipulieren.

Gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung des zuvor beschriebenen Biochips weist die Oberfläche im Bereich einer jeden Öffnung aufnahmeseitig eine Einrichtung zur Verbesserung des Kontaktes mit der Zellmembran auf, durch die eine verbesserte Haftung der Membran an dem Biochip im Bereich der Apertur (Öffnung) gewährleistet werden kann. Hierdurch lässt sich auch der elektrische Abdichtwiderstand erhöhen.

Entsprechend einer vorteilhaften Weiterbildung kann die Einrichtung zur Verbesserung des Kontaktes in Form einer Strukturierung der Oberfläche ausgebildet sein.

Hierzu kann die Strukturierung in Form eines oder einer Mehrzahl von Ringen, der oder die um jede Öffnung angeordnet sind, oder in Form eines oder einer Mehrzahl von Quadraten oder Rechtecken, das oder die um jede Öffnung angeordnet sind, vorgesehen sein.

Insbesondere kann die Strukturierung hierbei in Form einer um die Öffnung in geringem Abstand konzentrisch angeordneten Vertiefung in der Oberfläche des Biochips vorgesehen sein, deren Durchmesser ein Mehrfaches des Durchmessers der Öffnung beträgt, so dass der Rand der Öffnung aus dem sie umgebenen Niveau des Biochips nach oben herausragt. Auf diese Weise wird eine Zellemembran durch den Rand der Öffnung eingedellt, was zur Erhöhung des Kontakts zwischen Biochip und Membran führt.

Jede Öffnung kann Längen- und Breitenabmessungen aufweisen, die in einem Bereich von 10 μm bis 10 nm liegen. Hierdurch lässt sich die Anzahl der beobachteten Ionenkanäle einstellen. Des weiteren wird durch eine kleinere Öffnung auch die Membranfläche und damit die Kapazität verringert, was zu einer weiter verbesserten Messauflösung führt.

Der erfindungsgemäße Biochip eignet sich auch hervorragend zur Ausbildung künstlicher Lipidmembranen (künstliche Lipiddoppelschicht) auf der Öffnung, und zwar in Analogie zum bekannten Black-Lipid- oder Lipid-Bilayer-Verfahren. Hierdurch wird die Untersuchung von Ionenkanälen durch Fusion Ionenkanäle enthaltender Vesikel mit der künstlichen Lipiddoppelschicht ermöglicht.

Aufgrund der im Vergleich zum bekannten Bilayer-Verfahren geringen Größe der Apertur (bei bekannten Vorrichtungen ist die Größe der Apertur regelmäßig $> 100 \mu\text{m}$) und der daraus resultierenden geringen Kapazität lässt sich das Signal-Rauschverhältnis verbessern.

Entsprechend einer bevorzugten Ausführung der zuvor beschriebenen Biochips kann jede Öffnung im wesentlichen kreisförmig sein. Derartige Kreisformen lassen sich auf einfache Weise in den Biochip implementieren. Falls eine einfache Implementierung nicht erforderlich ist, können auch andere Formen für die Öffnungsquerschnitte gewählt werden.

Entsprechend einer vorteilhaften Weiterbildung aller zuvor beschriebener Biochips kann das Substrat einen Basisabschnitt mit einer ersten Dicke und einen bzw. eine Mehrzahl von

im Basisabschnitt ausgebildeten Fensterabschnitt bzw. Fensterabschnitten mit einer zweiten Dicke aufweisen, in dem bzw. in denen jeweils eine Öffnung vorgesehen ist. Insbesondere können hierbei die Dicke des Basisabschnitts in einem Bereich von 1 mm bis 100 μm und die Dicke des Fensterabschnitts in einem Bereich von 1 μm bis 50 μm liegen. Durch diese Weiterbildung bleibt die mechanische Stabilität des Substrats gewährleistet, während die Länge der Apertur (senkrecht zum Öffnungsquerschnitt) und damit auch der elektrische Zugangswiderstand möglichst gering bleiben. Außerdem können durch diese Weiterbildung mit Hilfe eines Trockenätzschritts, von Laserablation oder von Aufätzen einer latenten Ionenspur Aperturen mit Durchmessern von 10 μm bis hinab zu weniger als 1 μm erzeugt werden. Diese Weiterbildung ermöglicht darüberhinaus eine vereinfachte Befüllung mit Elektrolytlösung und elektrische Kontaktierung der Apertur. Die durch die lokale Ausdünnung entstehende Vertiefung an der Unterseite des Biochips erlaubt das einfache Einpipetieren von Lösungen, die durch Kapillarkräfte in die Apertur vordringen und diese füllen.

Entsprechend einer vorteilhaften Weiterbildung aller zuvor beschriebener Biochips kann das Substrat ein Halbleitermaterial, wie GaAs, Si, oder AlGaAs oder einen Isolator, wie Glas oder Quarz, oder Polymere, wie Polycarbonat, Plexiglas oder Polydimethylsiloxan (PDMS), umfassen. Durch diese Materialien lassen sich eine Vielzahl von Vorteilen, insbesondere eine einfache Herstellung durch eine für das jeweilige Material ausgereifte Prozesstechnik, erzielen.

Gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung besteht das Substrat mit dem Basisabschnitt und den darin ausgebildeten Fensterabschnitten aus einem Material. Dadurch kann das Herstellungsverfahren des Biochips vereinfacht werden.

Bei Verwendung eines Substrats aus Halbleitermaterial, insbesondere Si, GaAs oder AlGaAs, kann eine passivierende und isolierende Schicht, die einseitig oder beidseitig auf das Substrat aufgebracht wird, vorgesehen werden. Diese Isolationsschicht kann insbesondere aus SiO_2 , Si_3N_4 , Glas oder Polymeren, sowie aus Mehrschichtsystemen bestehen, in denen diese Materialien miteinander und/oder mit den oben genannten Halbleitern und/oder mit Metallen kombiniert werden, und Dicken von 50 nm bis zu mehreren μm aufweisen. Mit diesen Materialien kann ein Abdichtwiderstand von einigen $\text{G}\Omega$, wie er zur Messung von Strömen im pA-Bereich erforderlich ist, realisiert werden.

Die Isolationsschicht kann bei der Herstellung dieser Ausführungsform auch die Funktion einer Ätzstoppschicht erfüllen, und bei anisotropem Ätzen des Halbleiters zur Ausbildung eines Fensterabschnitts führen, in dem nur noch die Isolationsschicht vorhanden ist. Die Apertur kann dann lithographisch definiert und in die freitragende Isolationsschicht durch Trockenätzverfahren eingebracht werden.

Als weitere vorteilhafte Alternative lassen sich Polymere, wie Polydimethylsiloxan (PDMS) als Substratmaterial einsetzen. Bei der Herstellung des zuvor beschriebenen Biochips aus PDMS wird ein 3D-Negativtemplat (Gussform) verwendet, das die invertierte Struktur des gewünschten Biochips hat. Das PDMS ist zunächst zähflüssig und wird, nach Vermischen mit Härter, in die Gussform gegossen und mit oder ohne Erhitzen (etwa 60 bis 100 Grad Celsius) ausgehärtet. Der flexible Biochip kann daraufhin aus der Gussform ausgelöst werden, wobei eine vorherige Beschichtung der Gussform mit Silanen das Ablösen erleichtern kann. Für die Herstellung dieser Ausführungsform ist eine chemische Modifikation der Oberflächen (insbesondere Oxidation im Plasmaverascher aber auch andere geeignete Verfahren) vorteilhaft.

Darüber hinaus können sämtliche Oberflächen des Biochips zusätzliche isolierende und passivierende Schichten aus den bereits erwähnten Materialien, sowie chemische Modifikationen (Silanisierung, Oxidation) aufweisen.

Gemäß einer bevorzugten Weiterbildung aller zuvor beschriebenen Biochips können Elektroden auf einer oder auf beiden Seiten des Substrats vorgesehen sein. Insbesondere lassen sich Elektroden, z.B. aus Gold, Silber oder anderen geeigneten Metallen, direkt auf den Chip aufdampfen. Dies vereinfacht den Versuchsaufbau, da die Elektroden bereits fest auf dem Biochip integriert sind und demnach ein Anbringen und Justieren der Elektroden entfällt. Außerdem können durch eine derartige Anordnung, insbesondere wenn die Elektroden bis auf wenige μm an die Membran herangeführt werden, die parasitären Kapazitäten und Widerstände noch stärker verringert werden, was zu einer weiteren Verbesserung des Signal-zu-Rauschverhältnisses führt.

Ob ein Biochip mit integrierten Elektroden auf einer oder auf beiden Seiten des Substrats zum Einsatz kommt, kann in Abhängigkeit von dem durchzuführenden Versuch bestimmt werden. Als Elektroden eignen sich insbesondere Ag/AgCl-Elektroden. Diese Elektroden haben den Vorteil, dass eine Elektrodenpolarisierung, die zur Verfälschung der Messergebnisse führen würde, vermieden wird.

Außerdem können zusätzliche Elektroden integriert werden, so daß über die Apertur hochfrequente elektromagnetische Wechselfelder anlegbar sind. Insbesondere durch Anlegen eines hochfrequenten Wechselfelds im Bereich von MHz bis GHz lässt sich die Dynamik der Ionenkanäle (Konformationsänderungen, Ionenpermeation und Bindung von Liganden) beeinflussen bzw. analysieren. Zum Anlegen derartiger hochfrequenter Felder ist die Verwendung von Antennenstrukturen (z.B. die aus der Hochfrequenztechnik bekannte Bow-Tie-Antenne) besonders geeignet. Hierdurch kann eine effektive Kopplung des elektromagnetischen Feldes an den Ionenkanal erzielt werden. Eine vorteilhafte Alternative bildet die Integration planarer Wellenleiter (sog. strip-lines) für hochfrequente Wechselfelder.

Die Elektroden können hierbei eine Breite von 40 nm aufweisen und die Elektroden können bis auf wenige nm an die Öffnung herangeführt sein, um die Einkopplung der Leistung der Wechselfelder zu optimieren.

Bei der Verwendung eines Substrats mit einem Basisabschnitt mit einer ersten Dicke und einem bzw. einer Mehrzahl von im Basisabschnitt ausgebildeten Fensterabschnitt bzw. -abschnitten mit einer zweiten Dicke können Ag/AgCl-Elektroden in Form von Drähten oder gesinterten Kapseln (Pellets) in diese Vertiefung eingebracht werden, wodurch auch die Apertur elektrisch kontaktiert wird.

Zur mechanischen Manipulation von Zellen oder Flüssigkeiten auf dem Biochip können Interdigitalelektroden zur Erzeugung von akustischen Oberflächenwellen vorgesehen werden, mit deren Hilfe Zellen oder Flüssigkeiten relativ zur Apertur des Biochips positioniert werden können. Insbesondere können akustische Oberflächenwellen die Zellen in Bewegung halten, so daß sie nicht auf dem Chip anhaften, was es unmöglich machen würde, sie in die Apertur einzusaugen oder auf andere Weise dorthin zu bringen.

Ebenso wie Elektroden können gemäß einer bevorzugten Weiterbildung der zuvor beschriebenen Biochips auch elektrisch und/oder optisch aktive und/oder passive Bauelemente auf dem Substrat integriert sein. Hierdurch ergibt sich eine weitere strukturelle Vereinfachung des Versuchsaufbaus. Insbesondere können so auch die Signalwege kurz gehalten werden, was sich wiederum auf das Signal-zu-Rauschverhältnis günstig auswirkt. So können die Biochips beispielsweise integrierte Feldeffekttransistoreinrichtungen zur Vorverstärkung von Messsignalen aufweisen.

Die Elektroden, die elektrisch und/oder optisch aktive und/oder passive Bauelemente können vorteilhafterweise auf dem Substrat, gegebenenfalls auf der Ätzstoppschicht bzw. Isolationsschicht, integriert werden.

Entsprechend weiterer bevorzugter Ausführungsformen können in allen zuvor beschriebenen Biochips optische Nahfeldeinrichtungen zur Beobachtung des oder der Ionenkanäle vorgesehen sein. Die Möglichkeit Nahfeldeinrichtungen einzusetzen ergibt sich aus der geometriebedingt leichten Zugänglichkeit einer Membran auf dem Biochip. Insbesondere können deshalb alle Rastersondenverfahren, wie Rasterkraftmikroskopie (AFM), Optische Rasternahfeldmikroskopie (SNOM) und Rastertunnelmikroskopie (STM) problemlos zur Beobachtung der Membranen verwendet werden.

Darüber hinaus können aufgrund der geometriebedingt leichten Zugänglichkeit auch andere bildgebende Verfahren, wie beispielsweise Rasterelektronenmikroskopie (REM), konfokale Fluoreszenzmikroskopie (auch in Kombination mit SNOM), Fluoreszenzspektroskopie, optische Mikroskopie oder Einzelphotonendetektion eingesetzt werden. Insbesondere die Ausführung des Biochips in Glas oder Polydimethylsiloxan (PDMS) ist für Fluoreszenzuntersuchungen geeignet, da hier das Substrat einen geringen Fluoreszenzhintergrund aufweist.

Vorteilhafterweise können in den zuvor beschriebenen Biochips Mikrofluidkanäle zur on-chip Perfusion vorgesehen sein.

Gemäß einer besonders vorteilhaften Weiterbildung aller bisher beschriebenen Biochips ist aufnahmeseitig eine Schicht aus flexiblem, nicht elektrisch leitendem Polymer aufgetragen,

wobei die Schicht mindestens zwei Öffnungen aufweist, durch die mindestens die Öffnungen in dem Substrat freigelegt werden. Die Fläche einer Öffnung in der Polymerschicht ist somit mindestens so groß wie die Fläche einer Öffnung in dem Substrat. Die Schicht ist vorzugsweise 10 µm bis 5 mm dick und besteht beispielsweise aus PDMS. Die Öffnungen können beispielsweise gestanzt sein. Durch diese Öffnungen in dem flexiblen Polymer, deren Durchmesser beispielsweise 10-5000 µm sein kann, werden auf dem Biochip aufnahmeseitig einzelne Bereiche ähnlich Küvetten definiert, die der Aufnahme von Flüssigkeit dienen und in denen das Substrat des Biochips mit mindestens einer Apertur aufnahmeseitig frei liegt. Besonders vorteilhaft ist die dadurch aufnahmeseitig zugleich erreichte elektrische Trennung einzelner Aperturen voneinander. Dabei kann beispielsweise jede Öffnung in der Polymerschicht genau eine Apertur und einen Teil des umgebenden Substrats freilegen. Alternativ können durch eine Öffnung der Polymerschicht auch mehrere Aperturen freigelegt werden; in diesem Fall umfasst eine Küvette mehrere Aperturen. PDMS ist als Substrat für diese Küvetten besonders geeignet, da es gute adhäsive Eigenschaften gegenüber Glas und Quarz ebenso wie gegenüber den anderen oben genannten Substraten, aus denen der Biochip gestaltet sein kann, besitzt, sowie biokompatibel ist.

Alternativ kann durch chemische Behandlung die Substratoberfläche des Biochips hydrophob gemacht werden, sodaß aufnahmeseitig über den Aperturen abgesetzte Lösungstropfen mit steilem Kontaktwinkel aufliegen und stabil voneinander getrennt bleiben. Dadurch entsteht ohne Zuhilfenahme einer weiteren Struktur ein ebenfalls als Küvette wirksames Flüssigkeitskompartiment.

Gemäß einer weiteren besonders vorteilhaften Weiterbildung aller beschriebenen Biochips befinden sich in oder oberhalb der Substratoberfläche Kanäle parallel zur Substratoberfläche. In einer bevorzugten Alternative werden diese Kanäle direkt als Gräben in der Oberfläche des Substrats gebildet und sind dann nach oben offen. Gemäß einer anderen vorteilhaften Alternative ist der Biochip aufnahmeseitig mit einer Schicht aus PDMS oder einem beliebigen anderen, auf dem Biochip adhärennten Substrat versehen, das von zur Oberfläche des die Apertur enthaltenden Substrates des Biochips hin offenen Gräben durchzogen ist. Diese Gräben können insbesondere Durchmesser und Tiefen zwischen 5 und 500 µm aufweisen. Diese Gräben werden durch Aufbringen der sie enthaltenden Schicht auf den Biochip zu Fluidkanälen, die durch die Substratoberfläche des Biochips verschlossen wer-

den. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind diese Gräben so gestaltet, daß sie kreuz- oder sternförmig auf die Aperturen zu und von dort weg verlaufen. Weiterhin sind die Dimensionen dieser Kanäle in einer besonders bevorzugten Ausführungsform dieser Weiterbildung so bemessen, daß Zellen sich in einer durch die Kanäle strömenden Flüssigkeit entweder einzeln (eine nach der anderen) oder in anderer Anordnung durch sie hindurch bewegen. Daher sind solche Kanäle geeignet, Zellen horizontal zur Chipoberfläche von der Peripherie des Biochips gezielt über die Aperturen und über sie hinweg zu bewegen und zwar so, daß Anlegen von Unterdruck über eine Apertur unmittelbar zum Ansaugen der jeweils darüber befindlichen Zelle führt.

Die zuvor beschriebenen Biochips lassen sich auf einfache Weise herstellen. Grundsätzlich sind allen Verfahren folgende Schritte gemeinsam: Vorsehen eines Substrats, Ausbilden eines oder mehrerer Fensterabschnitte in dem Substrat, und Ausbilden je einer Öffnung pro Fensterabschnitt.

Im Falle eines Biochips auf Basis eines Halbleitersubstrat mit Isolationsschicht bietet sich für die Herstellung des Fensterabschnitts folgendes Verfahren an: eine dem nasschemischen Ätzverfahren (insbesondere KOH) gegenüber resistente, ober- und unterseitig vorhandene Isolationsschicht wird unterseitig durch einen Trockenätzschritt in einem lithographisch definierten Bereich entfernt, wodurch in diesem Bereich das Halbleitersubstrat direkt exponiert ist. Der folgende nasschemische Ätzschritt (insbesondere KOH) bewirkt dann durch anisotropes Ätzen die Ausbildung eines Ätzgrabens, der die Form einer umgekehrten Pyramide hat. Dieser Ätzgraben kann bei ausreichender Größe der primär exponierten Substratfläche bis auf die gegenüberliegende Seite reichen, bleibt jedoch in jedem Falle durch die gegenüberliegende, dem nasschemischen Ätzmittel gegenüber resistente Isolationsschicht, die also als Ätzstoppschicht wirkt, einseitig verschlossen. Hierdurch kann auf sehr einfache Weise eine präzise Ausbildung eines rechteckigen Fensterbereichs erhalten werden, dessen Fläche von der Fläche des unterseitig im ersten Schritt exponierten Substrats abhängt. Als Ätzstoppschicht bzw. Isolationsschicht haben sich hierbei insbesondere eine Si_3N_x -Schicht, vorzugsweise eine Si_3N_4 -Schicht, eine SiO_2 -Schicht oder $\text{Si}_3\text{N}_x/\text{SiO}_2$ -Mehrschichtssysteme als günstig erwiesen.

Schließlich kann durch optische Lithographie und einen Trockenätzschritt im Fensterabschnitt die Öffnung selbst gebildet werden. Dieses Verfahren eignet sich für vergleichsweise große Öffnungen (größer gleich $1\text{ }\mu\text{m}$). Sollen kleinere Öffnungen, d.h. bis herab zu 10 nm vorgesehen werden, lässt sich die Öffnung beispielsweise durch Elektronenstrahlolithographie und einen Trockenätzschritt bilden. In einer bevorzugten Alternative kann die Öffnung mittels eines fokussierten Ionenstrahls gebildet werden.

Bei Ausführung des Biochips auf Glassubstrat oder Quarzsubstrat kann ein isotropes HF-Ätzverfahren zur Definition des Fensterabschnitts durch lokale Ausdünnung des Glassubstrats zum Einsatz kommen. Ebenso kann alternativ der Fensterabschnitt durch Ablation mit einem Laser geeigneter Wellenlänge oder durch Heissformgebung (Heisspressen) ausgebildet werden.

Die eigentliche Öffnung kann zum einen durch Lithographie in Kombination mit einem Trockenätzschritt in das Fenster eingebracht werden. Im Fall dieser Substratmaterialien kann auch das Aufätzen einer latenten Spur eines einzelnen hochenergetischen Ions, das den ausgedünnten Fensterbereich durchlaufen hat, zur Herstellung der Apertur genutzt werden. Es ist ebenfalls bevorzugt möglich, in den ausgedünnten Fensterabschnitt die Apertur durch Ablation mit einem Laser geeigneter Wellenlänge einzubringen. Hier ist insbesondere die Verwendung eines Excimer-Lasers mit einer Wellenlänge im ultravioletten Bereich vorteilhaft. Insbesondere nach vorhergehendem Ausdünnen des Substrates im Fensterabschnitt auf zwischen 10 und $50\text{ }\mu\text{m}$ können durch Bestrahlung mit Laserlicht Aperturen mit Durchmessern von weniger als $10\text{ }\mu\text{m}$ bis hinab zu weniger als $1\text{ }\mu\text{m}$ erzeugt werden.

Gemäß einer bevorzugten Weiterbildung aller zuvor beschriebenen Biochips kann die Substratoberfläche, der Rand der Apertur oder die Innenwand der Apertur durch lokale Erwärmung, zum Beispiel mit einem Laser geeigneter Wellenlänge, behandelt werden (sogenanntes tempern), um die Eignung der Substratoberfläche, des Randes der Apertur oder ihrer Innenwand zur Ausbildung eines engen Kontaktes mit einer Zellmembran zu verbessern, sie zum Beispiel zu glätten oder die chemische Struktur des Substrats in geeigneter Weise zu verändern. Dies kann jedoch auch durch nichtlokale Erwärmung des gesamten Biochips geschehen. Die bei der lokalen oder nichtlokalen Erwärmung erreichten Tempe-

raturen können dabei sowohl unterhalb als auch oberhalb des Schmelzpunktes des jeweiligen Substrats liegen.

Bei einer Ausführung des Biochips aus PDMS entfällt der Ätzschritt, da hier mit einem Abdruckverfahren gearbeitet wird; d.h. sowohl Fensterabschnitt als auch Öffnungen werden von einem 3D-Negativtemplat übertragen. Die beschriebenen Ätz- und Lithographieverfahren kommen allerdings bei der Herstellung des Negativtemplats zum Einsatz.

Alle zuvor beschriebenen vorteilhaften Weiterbildungen lassen sich sowohl bei Biochips mit einer Öffnung ($M = N = 1$) als auch bei Biochips mit einer Mehrzahl von Öffnungen ($M > 1$ und/oder $N > 1$) einsetzen.

Alle zuvor beschriebenen Biochips lassen sich, abgesehen von herkömmlichen Untersuchungen von Ionenkanälen in Membranen auf vielfältigste Weise einsetzen.

In die Öffnung oder die Öffnungen des Biochips können Teilbereiche der Zellmembran von Zellen (z.B. isolierte Zellen aus Geweben oder Primärkulturen, sowie Zelllinien, die bestimmte Ionenkanäle exprimieren) inkorporiert werden. Dazu erfolgt vorteilhafterweise zunächst die Positionierung einer Zelle pro Apertur. Dazu werden vereinzelt (nicht miteinander zusammenhängende) Zellen in wässriger Suspension auf den Biochip aufgebracht, wobei die Apertur bereits mit einer Elektrolytlösung gefüllt ist.

Vorteilhafterweise werden die Zellen mit Hilfe von mindestens einer Pipette oder Kanüle aufgebracht. Dies kann automatisch, z.B. durch elektronisch gesteuerte xyz-Motoren, erfolgen. In einer bevorzugten Weiterbildung ist für jede Apertur eine eigene Pipette oder Kanüle vorgesehen.

Gemäß einer weiteren, besonders vorteilhaften Anordnung enthalten diese Pipetten oder Kanülen integrierte Elektroden, die zur Messung des Ionenstroms durch Ionenkanäle geeignet sind, und die über die in der Pipette oder Kanüle befindliche Elektrolytlösung mit der Küvette und also der Apertur in elektrischer Verbindung stehen. Dadurch entfällt die Notwendigkeit, solche Meßelektroden aufnahmeseitig auf dem Chipsubstrat vorzusehen.

Falls der Biochip, wie oben beschrieben, mit parallel zur Substratoberfläche verlaufenden Kanälen versehen ist, können eine oder mehrere vereinzelte Zellen über diese Kanäle in den Biochip eingespült und dann auf jeweils einer Öffnung positioniert werden.

Zur Positionierung einer Zelle auf der Apertur kann von der der Aufnahmeseite gegenüberliegenden Seite der Apertur aus ein Unterdruck angelegt werden, sodaß der entstehende Flüssigkeitsstrom eine Zelle auf die Apertur bewegt. Alternativ oder zusätzlich kann ein konstantes elektrisches Feld über die Apertur angelegt werden, was die Bildung eines dichten Anschlusses zwischen Zelle und Biochip fördert.

Ebenfalls alternativ oder zusätzlich können über geeignete, auf dem Biochip vorgesehene Elektroden Gleichspannungs- oder Wechspannungsfelder angelegt werden, durch die Zellen elektrophoretisch oder dielektrophoretisch auf die Apertur zubewegt werden oder dort festgehalten werden.

Ebenfalls alternativ oder zusätzlich können durch weitere Elektroden erzeugte akustische Oberflächenwellen verwendet werden, um Zellen oder Zellen enthaltende Flüssigkeitstropfen auf die Apertur zu positionieren.

Ebenfalls alternativ oder zusätzlich können über die Apertur weitere mechanische, chemische (z. B. osmotische oder onkotische), elektrische, magnetische oder elektromechanische Gradienten oder Felder angelegt werden, um Zellen direkt oder indirekt auf die Apertur zuzubewegen.

Alternativ oder zusätzlich können zur Positionierung von Zellen auf der Apertur weitere Zellen oder andere Partikel oder Lösungen aufnahmeseitig zugegeben werden, die durch ihr spezifisches Gewicht oder aufgrund anderer Eigenschaften die Zellen mechanisch und/oder durch andere Kräfte auf die aufnahmeseitige Oberfläche des Biochips und/oder auf die Apertur zubewegen und/oder dort festhalten.

Vorzugsweise werden alle beschriebenen Verfahren zur Positionierung einer Zelle auf einer Apertur auch dazu verwendet, die Zelle auf der Apertur zu fixieren.

Vorteilhafterweise wird mit den oben beschriebenen Biochips eine elektrophysiologische Charakterisierung jeder Zelle vorgenommen.

Über die Apertur kann analog der aus der Patch-Clamp-Technik bekannten sogenannten Ganzzellspannungsklemme auch Kontakt zum Innern einer ganzen Zelle hergestellt werden. Dies geschieht vorteilhafterweise durch sprunghafte, kurzzeitige (Dauer: vorzugsweise 10 ms bis 10 s, Amplitude: vorzugsweise -10 bis -1000 mmHg) Erniedrigung des Drucks in der Apertur (Saugpuls), durch Anlegen eines elektrischen Spannungspulses (Dauer: vorzugsweise 0.1 bis 1000 ms, Amplitude: vorzugsweise 100 mV bis 10 V) oder durch Zugabe eines Porenbildners (z.B. Gramicidin oder Nystatin) zur Perforation des in der Apertur befindlichen Membranabschnittes.

Die Anwesenheit einer Zelle über der Apertur kann durch Messung des Leitwertes oder der Hochfrequenzimpedanz oder anderer elektrischer Parameter der Apertur detektiert werden. Danach kann beispielsweise der Saugimpuls ausgelöst werden.

Vorteilhafterweise wird durch Einspülen oder Absaugen von Lösung eine Applikation oder Desapplikation von Wirkstoffen durchgeführt. Das Einspülen oder Absaugen kann durch Pipetten oder Kanülen erfolgen. Falls Fluidkanäle vorhanden sind können diese zum Einspülen oder Absaugen verwendet werden. Die Applikation oder Desapplikation von Wirkstoffen kann vor oder während einer Messung erfolgen.

Weiterhin können alle beschriebenen Biochips auf der der Aufnahmeseite gegenüberliegenden Unterseite mit Vorrichtungen versehen werden, die das einfache Anlegen eines Unter- oder Überdruckes gegenüber der Oberseite (d.h. eines Druckgradienten über die Aperturen) gestatten. Diese können beispielsweise als unter jeweils jeder Öffnung bzw. jedem Fensterbereich befindliche, flüssigkeitsgefüllte Hohlkammern in einem flexiblen Polymersubstrat (z.B. PDMS) ausgebildet sein, die jeweils mit der Apertur und durch sie mit der Oberseite des Biochips verbunden sind, und deren Volumen durch von außen wirkenden, durch eine mechanische Vorrichtung erzeugten Druck verkleinert, bzw. durch Verringern desselben wieder vergrößert werden kann.

Das Anlegen eines Druckgradienten über die Aperturen kann auch über Mikrofluidkanäle und damit verbundene Schlauchsysteme erfolgen.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann einer der beschriebenen Biochips auch mit einem weiteren, zweiten Biochip kombiniert werden, der mit einer Einrichtung zur Positionierung von Zellen relativ zu den Öffnungen des ersten Biochips versehen ist, wobei sich die jeweiligen aufnahmeseitigen Oberflächen in einem festen oder variablen Abstand gegenüber befinden. Diese Kombination kann beispielsweise durch eine feste oder flexible Verbindung beider Biochips geschehen, dergestalt, daß ihre jeweiligen aufnahmeseitigen Flächen einander gegenüberliegen und z.B. entweder durch einen Spalt von 10-1000 µm Breite getrennt sind oder direkt aneinander anliegen. Vorteilhafterweise umfasst die Einrichtung zur Positionierung von Zellen des zweiten Biochips eine Einrichtung zur Erzeugung von Oberflächenwellen. Falls die Biochips direkt aneinander gelagert sind, umfasst die aufnahmeseitige Oberfläche des zweiten Biochips vorzugsweise parallel zur Oberfläche verlaufende Fluidkanäle, die zur Oberfläche hin offen sind. In diesem Fall können die Zellen durch diese Fluidkanäle eingespült werden.

Die erfindungsgemäßen Biochips, können auch in einer Messsonde eingesetzt werden, mit einem Glasröhrchen, das auf der Seite des Substrats vorgesehen ist, die der Seite, auf der die Membran aufbringbar ist, gegenüberliegt, wobei die dem Substrat abgewandte Öffnung des Glasröhrchens so ausgebildet ist, dass eine Elektrode einführbar ist. Hierdurch kann eine Elektrode in ionischer Lösung zur Untersuchung des oder der Ionenkanäle an die Öffnung herangeführt werden.

Alternativ dazu kann statt eines Glasröhrchens eine Haltevorrichtung aus Polycarbonat oder einem anderen Material außer Glas vorgesehen sein, die über einen zentralen Hohlraum oder mehrere Hohlräume verfügt, der mit der Apertur bzw. die mit den Aperturen des Biochips kommunizieren und auf welche der Biochip aufgeklebt oder anders befestigt wird und in das eine Elektrode bzw. mehrere Elektroden in ionischer Lösung einführbar ist bzw. sind. An diesen mit den Aperturen des Biochips kommunizierenden Hohlräumen können wiederum Einrichtungen vorgesehen sein, die es erlauben, Über- oder Unterdruck anzulegen, um Zellen aus einer aufnahmeseitig aufgebrachten Suspension von der Apertur fernzuhalten oder anzusaugen. Insbesondere kann eine zwischen dem Biochip und der die

Hohlkammern enthaltenden Vorrichtung eine Schicht aus einem flexiblen Poymersubstrat (z.B. PDMS) vorgesehen sein, um einen dichten Abschluß zu gewährleisten.

So entsteht eine Einrichtung, in welcher der oben beschriebene Biochip auf einfache Weise integriert werden kann. Insbesondere kann diese Messsonde auch problemlos in bekannten Patch-Clamp-Aufbauten, insbesondere in aufrechte und invertierte optischen Mikroskopen sowie Messplätzen für optische und mechanische Rastersondenverfahren integriert werden.

Vorteilhafterweise kann in einer solchen Messsonde die dem Substrat abgewandte Öffnung des Glasröhrchens oder der Haltevorrichtung so ausgebildet sein, dass eine Elektrodeneinrichtung einschraubbar ist. In dieser Anordnung kann die Elektrodeneinrichtung schnell gewechselt werden und ist darüber hinaus wieder verwendbar. Diese Anordnung eignet sich unter anderem für einen Biochip, der integrierte Elektroden nur auf der Oberseite des Chips aufweist.

Die Messsonde kann zweckmäßigerweise auch zusammen mit der einschraubbaren Elektrode vertrieben werden.

In einer derartigen Anordnung sind zweckmäßigerweise zwischen der Öffnung des Glasröhrchens und der einschraubbaren Elektrode Dichtungsmittel, beispielsweise O-Ringe, vorgesehen, damit der Elektrolyt im Glasröhrchen bzw. in der Haltevorrichtung verbleibt.

Vorteilhafterweise ist das Glasröhrchen oder die Haltevorrichtung mit dem Substrat verklebt oder mit einem Dichtungsring mit dem Substrat verschraubbar. Hierdurch kann eine einfache und dichte Verbindung zwischen Glasröhrchen und Substrat sichergestellt werden. Die Verschraubung gemäß der zweiten Alternative führt zusätzlich zur einfachen Wiederverwertbarkeit des Biochips, da sie eine aggressive Reinigung des Biochips ermöglicht.

Die zuvor beschriebenen Messsonden können vorteilhaft so vorgesehen werden, dass sie eine Einrichtung zum Erzeugen von Unterdruck in dem Glasröhrchen bzw. in der Haltevorrichtung aufweisen. Mit dieser Einrichtung kann mit der üblichen Ansaugtechnik ein Membranfleck einer ebenfalls in Lösung befindlichen Zelle definiert werden. Damit können alle

zur Durchführung einer Analyse von Ionenkanälen erforderlichen Schritte an einer einzigen Vorrichtung durchgeführt werden. Dies führt zu einer verbesserten Handhabbarkeit der Vorrichtung.

Im folgenden werden besondere Ausführungsformen der Erfindung unter Bezugnahme auf die beigefügte Zeichnung erläutert. In der Zeichnung zeigen:

- Fig. 1a eine Schnittansicht einer ersten Ausführungsform eines Biochips gemäß der vorliegenden Erfindung;
- Fig. 1b eine Draufsicht auf die erste Ausführungsform eines Biochips gemäß der vorliegenden Erfindung;
- Fig. 1c eine Draufsicht auf eine Abwandlung der ersten Ausführungsform eines Biochips gemäß der vorliegenden Erfindung;
- Fig. 2 eine zweite Ausführungsform des Biochips gemäß der vorliegenden Erfindung;
- Fig. 3 eine dritte Ausführungsform des Biochips gemäß der vorliegenden Erfindung;
- Fig. 4 eine Ausführungsform der Messsonde gemäß der vorliegenden Erfindung; und
- Fig. 5 eine Pipette zur Untersuchung von Ionenkanälen gemäß dem Stand der Technik.

Figur 1a und 1b zeigen eine erste Ausführungsform 1 eines Biochips gemäß der vorliegenden Erfindung.

Dieser Biochip umfasst ein Substrat, in dem eine Öffnung 19 zur Aufnahme einer wenigstens einen Ionenkanal umfassenden Zellmembran vorgesehen ist. Im vorliegenden Fall ist ein Biochip mit $M = N = 1$ dargestellt.

Das Substrat umfasst einen Basisabschnitt 10 mit einer ersten Dicke d_1 und einen Fensterabschnitt 11 mit einer zweiten Dicke d_2 , in dem die Öffnung 19 vorgesehen ist.

Die Dicke des Basisabschnitts 10 liegt in einem Bereich von 1 mm bis 100 μm und die Dicke des Fensterabschnitts liegt in einem Bereich von 1 μm bis 50 nm. Der Fensterabschnitt hat hierbei eine Fläche von einigen 10 μm^2 bis 0.1 mm^2 .

Die Öffnung 19 ist im wesentlichen kreisförmig und hat einen Durchmesser, der in einem Bereich von 10 μm bis 10 nm liegt. Die Größe der Öffnung bestimmt sich danach, wie viele Ionenkanäle in einer Zellmembran untersucht werden sollen.

Der Biochip 1 ist aus einem (0001)-Quarz (Z-Schnitt) gebildet, in den zunächst durch einen anisotropen nasschemische Ätzschritt der Fensterabschnitt 11 ausgebildet wird. Als Ätzmittel wird hierbei HF verwendet.

Im letzten Schritt wird, je nach Größe der erwünschten Öffnung, diese Öffnung durch optische Lithographie und einen Trockenätzschritt oder durch Elektronenstrahlolithographie und einen Trockenätzschritt gebildet.

Weiterhin ist die Oberfläche des Biochips gemäß Figur 1 im Bereich der Öffnung mit einer Einrichtung zur Verbesserung des Kontaktes zwischen Biochip und Zellmembran versehen. Diese Einrichtung ist vorliegend durch eine Strukturierung der Oberfläche ausgebildet. Hierzu sind ringförmige Erhebungen 15, die um die Öffnung angeordnet sind, vorgesehen.

Durch diese Erhebungen wird eine zu untersuchende Membran mit einem Ionenkanal eingedellt, wodurch aufgrund eines Hydraulikeffekts eine bessere Haftung erzielt wird und der elektrische Abdichtwiderstand erhöht wird.

Die Strukturierung in dem Biochip gemäß Figur 1a und 1b ist hierbei lediglich beispielhaft zu verstehen. Insbesondere lassen sich auch andere Formen von Erhöhungen einsetzen, beispielsweise ein oder eine Mehrzahl von Quadraten oder Rechtecken, das oder die um jede Öffnung angeordnet sind. Eine dieser Alternativen ist in Figur 1c dargestellt.

Figur 2 zeigt eine zweite Ausführungsform eines Biochips gemäß der vorliegenden Erfindung.

Dieser Biochip weist ebenfalls ein Substrat 20, 21, in dem eine Öffnung 29 zur Aufnahme einer wenigstens einen Ionenkanal umfassenden Zellmembran vorgesehen ist. Auch für den in Figur 2 dargestellten Biochip ist $M = N = 1$.

Die geometrische Form und die Abmessungen des Biochips 2 entsprechen denen des in Figur 1 gezeigten Biochips 1. Zur Vermeidung von Wiederholungen wird in diesem Zusammenhang lediglich auf die entsprechende Beschreibung der Figur 1 verwiesen. Die Bezugszeichen einander entsprechender Teile unterscheiden sich hierbei nur in ihrer ersten Ziffer.

Das Substrat des Biochips 2 umfasst einen Basisabschnitt 20, der ebenfalls aus Quarz gebildet ist, und eine Ätzstoppschicht, in welcher der Fensterabschnitt 21 ausgebildet ist. Diese Ätzstoppschicht besteht aus Si_3N_x , vorzugsweise Si_3N_4 .

Gegenüber dem Biochip 1 auf Figur 1 zeichnet sich der Biochip 2 dadurch aus, dass er durch ein vereinfachtes Verfahren herstellbar ist.

So wird auf das Substrat 20 zunächst ein Ätzstoppfilm aufgebracht. Anschließend wird von der gegenüberliegenden Seite durch einen anisotropen nasschemischen HF-Ätzschritt der Fensterabschnitt 11 bis zur Ätzstoppschicht gebildet. Abschließend wird die Öffnung, vorzugsweise durch eines der im Zusammenhang mit der ersten Ausführungsform beschriebenen Verfahren, gebildet.

In Figur 3 ist eine dritte Ausführungsform eines Biochips 3 gemäß der vorliegenden Erfindung dargestellt.

Bezüglich der geometrischen Abmessungen und Aufbaus entspricht der Biochip 3 im wesentlichen dem Aufbau der in den Figuren 1 und 2 beschriebenen Biochips, so dass auch hier zur Vermeidung von Wiederholungen auf die Beschreibung dieser Chips verwiesen wird. Die Bezugszeichen einander entsprechender Teile unterscheiden sich hierbei nur in ihrer ersten Ziffer.

Im Gegensatz zu den dort gezeigten Biochips besteht der Basisabschnitt 30 des Substrats aus einem Halbleitermaterial, beispielsweise (100)-Si.

Auf diesem Halbleitermaterial ist eine isolierende Schicht aufgebracht, in welcher der Fensterabschnitt 31 ausgebildet ist. Die isolierende Schicht 31 dient außerdem im Herstellungsverfahren als Ätzstoppschicht.

Der Herstellungsvorgang ist demnach dem in Figur 2 hergestellten Biochip ähnlich. In der dargestellten Ausführungsform besteht diese Schicht aus Si_3N_4 .

Insbesondere wird zuerst auf den Siliziumbasisabschnitt 30 die Isolations- und Ätzstoppschicht mit einem PECVD-Verfahren aufgebracht. Dann wird von der anderen Seite durch einen anisotropen nasschemischen KOH-Ätzschritt der Fensterabschnitt 31 in dem Substrat ausgebildet. Hierbei wird bis zur Ätzstoppschicht durchgeätzt. Anschließend kann, wie in den zuvor beschriebenen Ausführungsformen in Abhängigkeit von der erwünschten Größe der Öffnung diese durch optische Lithographie bzw. Elektronenstrahlolithographie und einen Trockenätzschritt ausgebildet werden.

Im letzten Schritt werden schließlich noch Elektroden 32 und 33, die im vorliegenden Fall aus Ag/AgCl bestehen, auf die Oberseite und die Unterseite des Substrats aufgebracht.

In Figur 3 ist darüber hinaus dargestellt, wie eine Membran Me mit einem Ionenkanal I in die Öffnung 39 eingebracht worden ist. Zur anschließenden Messung, die unter Bezugnahme auf Figur 4 noch im Detail beschrieben wird, muss eine Elektrolytflüssigkeit 34 über Membran und Elektrode 32, sowie im Ätzgraben, vorgesehen werden.

In den Figuren 1 bis 3 sind jeweils Biochips mit $M = N = 1$ dargestellt. Selbstverständlich gilt oben Gesagtes auch für Biochips mit Substraten, in denen eine Mehrzahl von Öffnungen vorgesehen sind. Diese Öffnungen können in Form eines $M \times N$ -Arrays vorgesehen sein. Hierbei können sie regelmäßig oder reihenweise versetzt angeordnet werden.

Die in den Figuren 1 bis 3 dargestellten Biochips stellen lediglich bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung dar, und sind nicht als Beschränkung derselben zu verstehen.

Dem gemäß sind eine Vielzahl anderer, nicht gezeigter Ausführungsformen möglich.

Beispielsweise ist es nicht erforderlich, dass die Öffnung kreisförmig ausgebildet ist. Sie kann je nach Anforderung verschiedene Querschnitte aufweisen.

Außerdem lassen sich verschiedene Materialien zur Ausbildung der Biochips einsetzen. So kann beispielsweise anstelle des Quarzes auch Glas und anstelle des Silizium ein anderes Halbleitermaterial, beispielsweise GaAs, verwendet werden.

Insbesondere im Fall eines Substrats aus Halbleitermaterial, allerdings nicht beschränkt hierauf, können die Oberflächen des Substrats mit einer passivierenden Schicht überzogen werden.

Weiterhin lassen sich auch verschiedenartige Elektroden einsetzen, beispielsweise solche, die zur Erzeugung eines elektromagnetischen Feldes im Bereich des Ionenkanals geeignet sind.

Darüber hinaus können elektrisch und/oder optisch aktive und/oder passive Bauelemente auf dem Substrat integriert werden.

Ebenso lassen sich zur Herstellung der Biochips verschiedene aus der Halbleitertechnologie hinreichend bekannte Verfahren in Abhängigkeit von dem jeweils verwendeten Materialien einsetzen.

In Figur 4 ist eine Messsonde gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung dargestellt.

Diese Messsonde umfasst ein Substrat mit einem Basisabschnitt 40 und einem Fensterabschnitt 41, in dem eine Öffnung 49 ausgebildet ist. Auf dem Substrat ist weiterhin eine erste Elektrode 42 angeordnet.

Unter dem Substrat 40 ist eine Haltevorrichtung 45, die über einen zentralen Hohlraum verfügt, der mit der Apertur 49 kommuniziert, befestigt, an die sich eine Elektrode 43 mit Halterung anschließt.

Weiterhin umfasst die Messsonde eine Einrichtung zum Erzeugen von Unterdruck in der Haltevorrichtung, die durch das Bezugszeichen 46 angedeutet ist.

Neben der dargestellten Ausführungsform der Messsonde, die nicht als Beschränkung der vorliegenden Erfindung zu verstehen ist, sind weitere Abwandlungen möglich.

Als Biochips lassen sich beispielsweise beliebige der erfindungsgemäßen Biochips einsetzen. Insbesondere die Abmessungen bestimmen sich hierbei nach dem Einsatzgebiet, also insbesondere der Zahl der zu untersuchenden Kanäle.

Die Haltevorrichtung kann beispielsweise mit dem Substrat verklebt werden.

Die Elektrodeneinrichtung mitsamt Halterung kann so ausgebildet werden, dass sie von unten in die Haltevorrichtung einschraubbar ist.

Weiterhin kann zwischen der Öffnung der Haltevorrichtung und der einschraubbaren Elektrode ein Dichtungsring vorgesehen sein.

Im folgenden wird beschrieben, wie mit der vorliegenden Messsonde Ionenströme durch den Ionenkanal gemessen werden können.

Zunächst wird eine Zellmembran in Elektrolytlösung auf das Substrat aufgebracht. Durch Betätigung der Einrichtung zum Erzeugen von Unterdruck 46 wird die Membran mitsamt dem Ionenkanal in die Öffnung gesaugt. In der Messsonde befindet sich ebenfalls eine Elektrolytlösung 44. Über die beiden Elektroden 42 und 43 kann schließlich der durch den Ionenkanal fließende Strom gemessen werden.

Patentansprüche

1. Biochip (1; 2; 3) zur Untersuchung von Ionenkanälen, mit einem Substrat (10; 20; 30), in welchem Öffnungen (19; 29; 39) zur Aufnahme einer wenigstens einen Ionenkanal (I) umfassenden Zellmembran (Me) oder einer künstlichen wenigstens einen Ionenkanal umfassenden Lipidmembran in Form einer M×N Matrix vorgesehen sind, wobei $M \geq 1$ und $N \geq 1$.
2. Biochip (1; 2; 3) nach Anspruch 1, in welchem die Oberfläche des Biochips im Bereich einer jeden Öffnung aufnahmeseitig eine Einrichtung zur Verbesserung des Kontaktes von Zellmembran und Biochip aufweist.
3. Biochip nach Anspruch 2, in welchem die Einrichtung zur Verbesserung des Kontaktes in Form einer Strukturierung der Oberfläche ausgebildet ist.
4. Biochip nach Anspruch 3, in welchem die Strukturierung in Form eines oder einer Mehrzahl von Ringen, der oder die um jede Öffnung angeordnet sind, oder in Form eines oder einer Mehrzahl von Quadraten oder Rechtecken, das oder die um jede Öffnung angeordnet sind, vorgesehen ist.
5. Biochip nach einem der Ansprüche 1 bis 4, in welchem jede Öffnung im wesentlichen kreisförmig ist.
6. Biochip nach einem der vorangegangenen Ansprüche, in welchem das Substrat einen Basisabschnitt (10; 20; 30) mit einer ersten Dicke (d_1) und im Basisabschnitt ausgebildete Fensterabschnitte (11; 21; 31) mit einer zweiten Dicke (d_2) aufweist, wobei jede Öffnung in einem entsprechenden Fensterabschnitt vorgesehen ist.
7. Biochip nach einem der vorangegangenen Ansprüche, in welchem das Substrat ein Halbleitermaterial, wie GaAs, Si, oder AlGaAs oder einen Isolator wie Glas oder Quarz oder Polymere, wie Polydimethylsiloxan (PDMS) umfasst.

8. Biochip nach Anspruch 6 oder 7, in welchem das Substrat mit dem Basisabschnitt und den im Basisabschnitt ausgebildeten Fensterabschnitten aus einem Material besteht.
9. Biochip nach einem der vorangegangenen Ansprüche, in welchem Elektroden auf einer oder auf beiden Seiten des Substrats vorgesehen sind.
10. Biochip nach Anspruch 9, in welchem die Elektroden so ausgebildet sind, dass ein zeitlich konstantes elektromagnetisches Feld und/oder ein hochfrequentes elektromagnetisches Wechselfeld anlegbar ist.
11. Biochip nach einem der vorangegangenen Ansprüche, in welchem planare Wellenleiter zum Anlegen hochfrequenter Wechselfelder integriert sind.
12. Biochip nach einem der vorangegangenen Ansprüche, an welchem Interdigitalelektroden zur Erzeugung von akustischen Oberflächenwellen vorgesehen sind.
13. Biochip nach einem der vorangegangenen Ansprüche, in welchem aktive und/oder passive Bauelemente auf dem Substrat integriert sind.
14. Biochip nach einem der vorangegangenen Ansprüche, in welchem die aktiven und/oder passiven Bauelemente eine Feldeffektverstärkereinrichtung zur Vorverstärkung von Messsignalen aufweist.
15. Biochip nach einem der vorangegangenen Ansprüche, in welchem eine optische Nahfeldeinrichtung zur Beobachtung des oder der Ionenkanäle vorgesehen ist.
16. Biochip nach Anspruch 15, in welchem die optischen Nahfeldeinrichtungen Raster-sondeneinrichtungen umfassen.
17. Biochip nach einem der vorangegangenen Ansprüche, in welchem Mikrofluidkanäle zur on-chip Perfusion vorgesehen sind.

18. Biochip nach einem der vorangegangenen Ansprüche, auf welchem aufnahmeseitig eine Schicht aus flexiblem, nicht elektrisch leitendem Polymer aufgetragen ist, wobei die Schicht mindestens zwei Öffnungen aufweist, durch die mindestens die Öffnungen in dem Substrats freigelegt werden.
19. Biochip nach einem der Ansprüche 1 – 17, wobei die aufnahmeseitige Oberfläche hydrophob ist.
20. Biochip nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei sich in oder oberhalb der Substratoberfläche Kanäle parallel zur Substratoberfläche befinden.
21. Verfahren zur Herstellung eines Biochips zur Untersuchung von Ionenkanälen, mit einem Substrat, in welchem Öffnungen zur Aufnahme einer wenigstens einen Ionenkanal umfassenden Zellmembran oder einer künstlichen wenigstens einen Ionenkanal umfassenden Lipidmembran in Form einer $M \times N$ Matrix vorgesehen sind, wobei $M \geq 1$ und $N \geq 1$, mit den Schritten:

Vorsehen eines Substrats,

Bilden mindestens eines Fensterabschnittes in dem Substrat, und

Ausbilden einer Öffnung in jedem Fensterabschnitt.

22. Verfahren nach Anspruch 21, in welchem jeder Fensterabschnitt mittels Nass- oder Trockenätzverfahren gebildet wird.
23. Verfahren nach Anspruch 21, in welchem jeder Fensterabschnitt mittels Laserausdünnung oder Heißformgebung gebildet wird.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 21 – 23, in welchem jede Öffnung mittels Laserausdünnung oder Ionenspurätzen ausgebildet wird.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 21 – 23, in welchem jede Öffnung mittels Trockenätzverfahren oder einem fokussierten Ionenstrahl gebildet wird.
26. Verfahren nach einem der Ansprüch 21 – 25, mit dem weiteren Schritt:
- lokale oder nichtlokale Wärmebehandlung des Substrats zur Verbesserung des Kontakts mit einer Zellmembran.
27. Verfahren zur Untersuchung von Ionenkanälen in Membranen mit den Schritten:
- Bereitstellen eines Biochips gemäß einem der Ansprüche 1 – 19,
- Aufbringen einer oder mehrerer einzelner Zellen in wässriger Suspension auf den Biochip,
- Positionierung von höchstens einer Zelle auf einer Öffnung.
28. Verfahren nach Anspruch 27, in welchem die Zellen mit Hilfe von mindestens einer Pipette oder Kanüle aufgebracht werden.
29. Verfahren nach Anspruch 28, in welchem die Ionenkanalströme mit Hilfe von in jeder Pipette oder Kanüle integrierten Elektroden gemessen werden.
30. Verfahren zur Untersuchung von Ionenkanälen in Membranen mit den Schritten:
- Bereitstellen eines Biochips gemäß Anspruch 20,
- Einspülen einer oder mehrerer einzelner Zellen in wässriger Suspension in den Biochip über die parallel zur Substratoberfläche befindlichen Kanäle,
- Positionierung von höchstens einer Zelle auf einer Öffnung.

31. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 – 30, in welchem zur Positionierung jeder Zelle an der der Aufnahmeseite gegenüberliegenden Seite einer Öffnung ein Unterdruck angelegt wird.
32. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 – 31, in welchem zur Positionierung jeder Zelle eine elektrische Gleich- und/oder Wechselspannung senkrecht zur Substratoberfläche angelegt werden.
33. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 – 32, in welchem zur Positionierung jeder Zelle akustische Oberflächenwellen verwendet werden.
34. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 – 33, in welchem zur Positionierung jeder Zelle durch die Öffnung mechanische, chemische, elektrische, magnetische oder elektromechanische Gradienten oder Felder angelegt werden.
35. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 – 34, in welchem zur Positionierung jeder Zelle weitere Zellen oder Partikel aufnahmeseitig zugegeben werden.
36. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 – 35 mit dem weiteren Schritt:

Detektierung jeder Zelle auf einer Öffnung durch Messung mindestens eines elektrischen Parameters der Öffnung.

37. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 – 36 mit dem weiteren Schritt:

elektrophysiologische Charakterisierung jeder Zelle.

38. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 – 37, in welchem durch Einspülen oder Absaugen von Lösung Wirkstoffe appliziert oder desappliziert werden.
39. Vorrichtung zur Untersuchung von Ionenkanälen in Membranen, umfassend:

einen ersten Biochip nach einem der Ansprüche 1 – 20 und

einen zweiten Biochip mit einer Einrichtung zur Positionierung von Zellen relativ zu den Öffnungen des ersten Biochips,

wobei sich die jeweiligen aufnahmeseitigen Oberflächen in einem festen oder variablen Abstand gegenüber befinden.

40. Vorrichtung nach Anspruch 39, wobei die Einrichtung zur Positionierung von Zellen eine Einrichtung zur Erzeugung von Oberflächenwellen umfasst.

41. Vorrichtung nach Anspruch 39 oder 40, wobei die Biochips direkt aneinander gelagert sind und in die aufnahmeseitige Oberfläche des zweiten Biochips parallel zur Oberfläche verlaufende, zur Oberfläche hin offene Fluidkanäle integriert sind.

42. Meßsonde (4), umfassend

einen Biochip (1; 2; 3) nach einem der Ansprüche 1 – 20,

eine Haltevorrichtung (45), die über einen zentralen Hohlraum oder mehrere Hohlräume verfügt, der mit der Apertur bzw. den Aperturen des Biochips (1; 2; 3) kommunizieren und die auf der Seite des Substrats vorgesehen ist, die der Seite, auf der die Membran (M) aufbringbar ist, gegenüberliegt, wobei

die dem Substrat abgewandte Öffnung der Haltevorrichtung so ausgebildet ist, daß eine Elektrodeneinrichtung (43) einführbar ist.

43. Meßsonde nach Anspruch 42, in welcher die Haltevorrichtung aus Glas oder Polycarbonat besteht.

44. Meßsonde nach Anspruch 42 oder 43, in welcher die Haltevorrichtung mit dem Biochip verschraubbar ist.

45. Meßsonde nach einem der Ansprüche 42 – 44, in welcher zwischen Haltevorrichtung und Biochip Dichtungsmittel vorgesehen sind.
46. Meßsonde nach Anspruch 42 oder 43, in welcher die Haltevorrichtung mit dem Substrat verklebt ist.
47. Meßsonde nach einem der Ansprüche Anspruch 42 – 46, in welcher die Elektroden-einrichtung in das Glasröhrchen einschraubbar ist.
48. Meßsonde nach Anspruch 47, in welcher zwischen Haltevorrichtung und Elektroden-einrichtung Dichtungsmittel vorgesehen sind.
49. Meßsonde nach einem der Ansprüche 42 – 48, in welcher eine Einrichtung zum Erzeugen von Unterdruck (46) in dem Glasröhrchen vorgesehen ist.

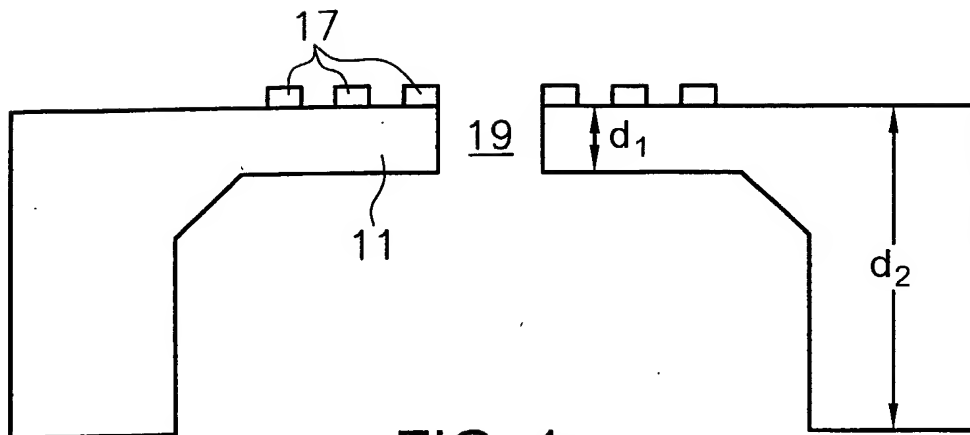


FIG. 1a

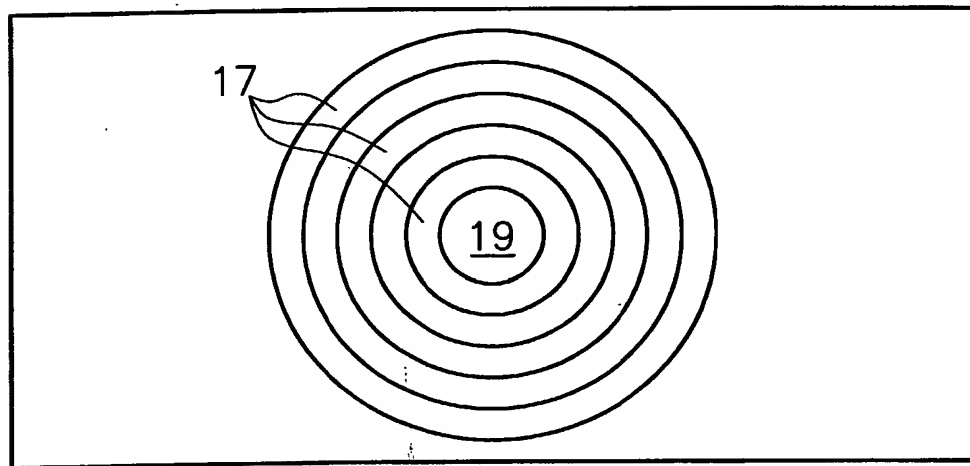


FIG. 1b

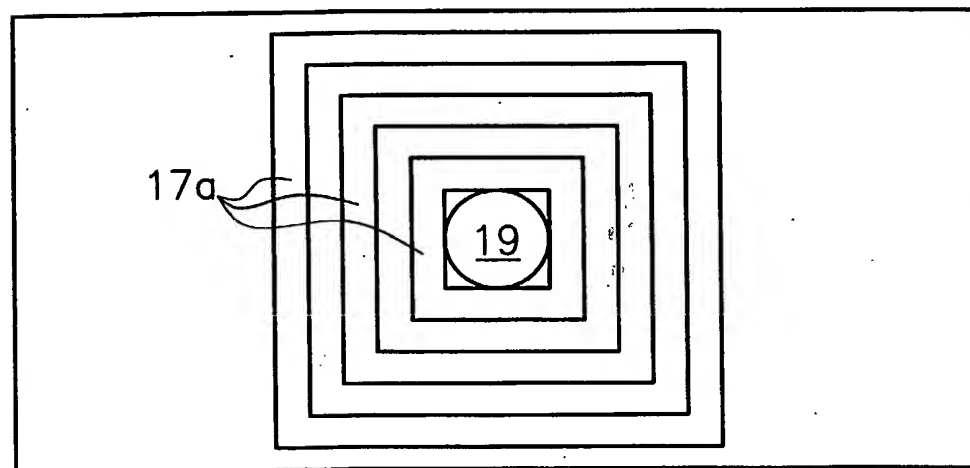


FIG. 1c

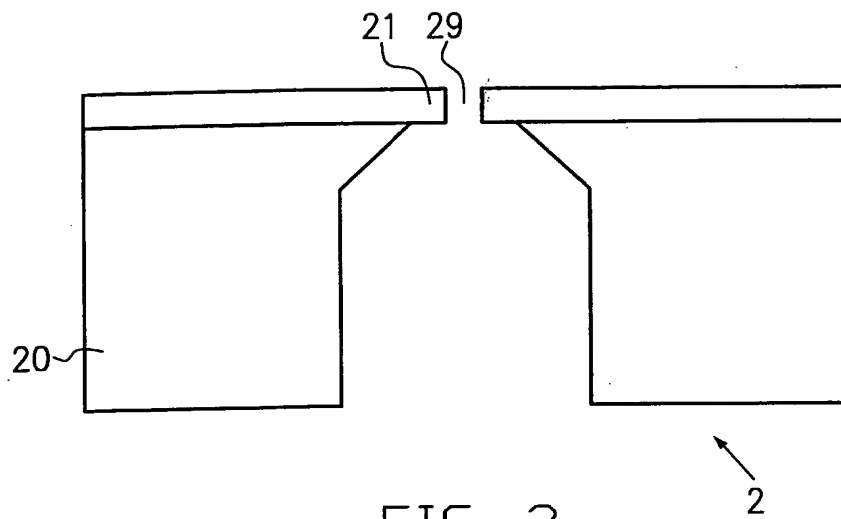


FIG. 2

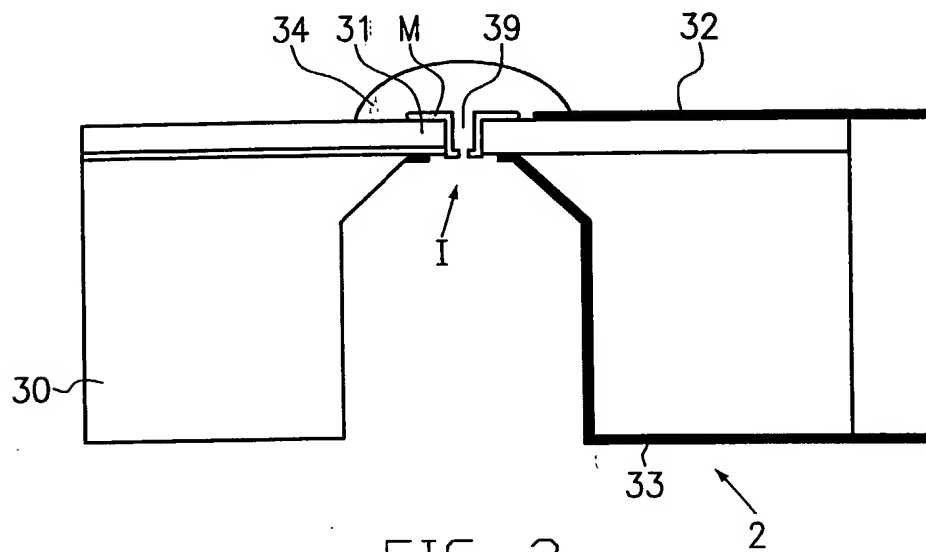


FIG. 3

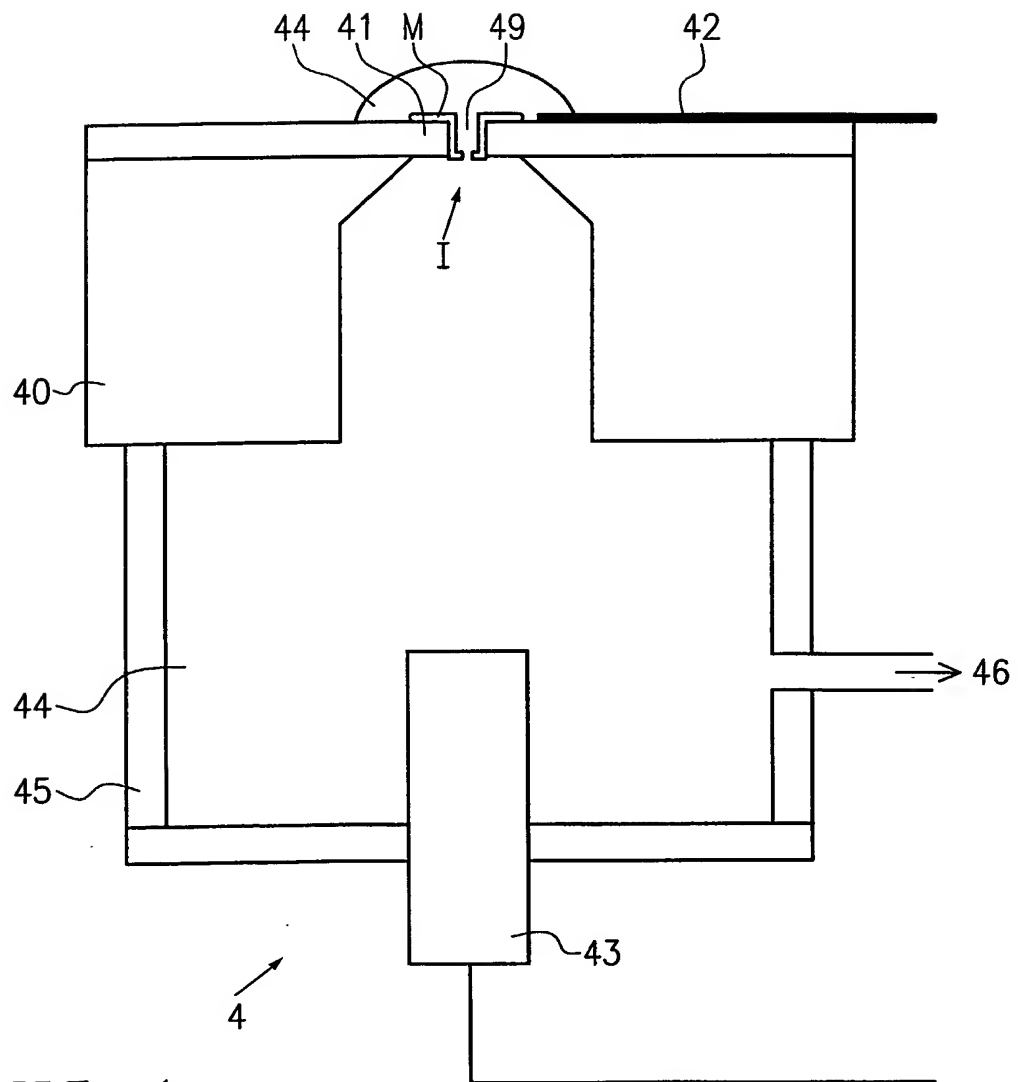


FIG. 4

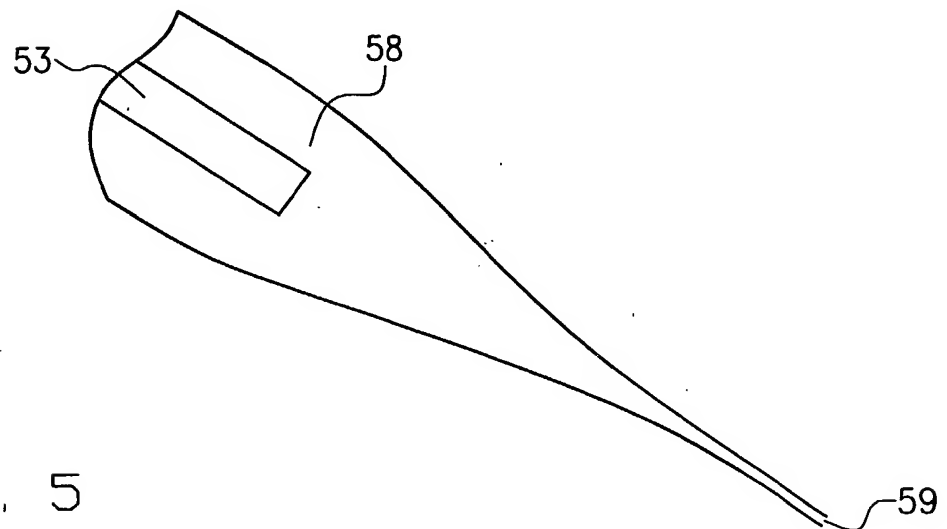


FIG. 5